

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИРОДЫ ФАКТОРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ, ОБЛАДАЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

*Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И.,
Егоров С.К., Полещук Е.Н.*

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Введение. Антибиотикостойчивость болезнетворных бактерий считается одной из наиболее актуальных проблем современной инфектологии; тем не менее, до настоящего времени данное явление рассматривалось лишь как свойство микроорганизмов. При этом забывают, что макроорганизм также небезразличен к введению антибиотиков. Антибиотики являются для организма чужеродными веществами, от которых он стремится освободиться, используя для этого разнообразные механизмы. В частности, в наших предыдущих работах было показано, что в крови у 33,82% больных шигеллезом определяются поликлональные IgG, обладающие бета-лактамазной активностью [1, 2]. В процессе изучения этих каталитических антител нами был случайно обнаружен феномен необычно высокой пенициллиназной активности сыворотки крови. Выяснилось, что данное свойство крови характерно для большинства (85-92%) больных и здоровых лиц, причем уровень активности достаточно высок (за 20 минут инкубации при 37°C распадалось в среднем 52% от внесенного в пробу сыворотки крови ампициллина и 78% от внесенного в пробу бензилпенициллина) [3]. Данный феномен ранее не был описан в

мировой научной литературе. Соответственно, целью настоящего исследования было установление природы факторов, обуславливающих значительную бета-лактамазную активность человеческой крови.

Материалы и методы. Разделение сыворотки крови на фракции было произведено путем осаждения белков добавлением насыщенного раствора сульфата аммония (ч.д.а.) до суммарной концентрации 33, 40 и 50% насыщения. Осадок, растворенный в физиологическом растворе хлорида натрия, диализовался трехкратно против 2 л 0,85% раствора хлорида натрия. Параллельно производился диализ пробы сыворотки крови, где осаждение сульфатом аммония не производилось. Диализ второй пробы сыворотки крови, также не подвергавшейся осаждению сульфатом аммония, производился однократно против 5 мл 0,85% раствора натрия хлорида в течение 48 часов, диализат был в дальнейшем собран и использован для исследования.

Для диализа были использованы диализные пакеты Sigma D6191-25EA с порами, задерживающими все белки с молекулярным весом вплоть до 12 кДа. В каждой пробе был произведен замер концентрации белка по стандартной методике Лоури [4].

В дальнейшем была определена бета-лактамазная активность всех проб модифицированным неокупроиновым методом [3, 5]. В качестве субстратов для определения каталитической активности сыворотки крови мы использовали химически чистые субстанции бензилпенициллина натриевой соли и ампициллина тригидрата (Sigma).

Результаты и обсуждение. Бета-лактамазная активность белкового осадка оказалась относительно невысока и составила от 6,7% до 12% для ампициллина и от 6,4% до 19,2% для бензилпенициллина, при этом уровень распада антибиотиков практически не зависел от концентрации сульфата аммония. Следует принять во внимание, что 33% сульфат аммония осаждает практически исключительно гамма-глобулины.

В пробах надосадочной жидкости бета-лактамазная активность оказалась минимальной - от 0 до 7,7% для ампициллина и от 1,8% до 3,2% для бензилпенициллина, данная активность явно не зависела от концентрации сульфата аммония в растворе.

В пробе сыворотки крови №1, диализовавшейся однократно против 5 мл 0,85% раствора хлорида натрия, уровень распада ампициллина составил 58,5%, а бензилпенициллина - 75,8%. В диализном же растворе данные уровни оказались равны 58,7% и 63,0%, соответственно. Следовательно, с учетом погрешности методики определения можно считать, что бета-лактамазная активность практически поровну распределилась между данной пробой сыворотки и диализным раствором. При этом обращает на себя внимание существенная разница в концентрациях общего белка в сыворотке крови (22 г/л) и диализном растворе (3,7 г/л). В пробе сыворотки крови №2, диализовавшейся трехкратно против несопоставимо большего объема 0,85% раствора хлорида натрия, уровень распада ампициллина составил лишь 7,8%, а бензилпенициллина - 10,5%. Концентрация белка в пробах сыворотки №1 и №2 оказалась практически одинаковой (22 и 24,5 г/л, соответственно), при этом бета-лактамазная активность этих проб различалась в 7,2-7,5 раза

В пробах осадка, полученных при осаждении сульфатом аммония, и концентрация белка, и уровень распада антибиотиков различались незначительно (разница не более 20%).

Выводы. Из результатов эксперимента следует, что в человеческой крови существует некая фракция с молекулярным весом менее 12 кДа, обладающая пенициллиназной активностью. Возможно, данная фракция представляет собой комплекс из низкомолекулярных пептидов и продуктов распада гема. Так, в наших исследованиях (еще неопубликованных) показано, что концентрация общего и прямого билирубина в крови больных рожей и пневмонией прямо коррелирует с уровнем распада бензилпенициллина ($r=0,9-1$), а билирубин в чистом виде и в смеси с человеческим сывороточным альбумином проявляет бета-лактамазную активность. Эта фракция определяет 81-92% от общей бета-лактамазной активности крови; не исключено, что данная субстанция имеет биоорганическую, но небелковую природу. Одновременно в крови присутствует фракция высокомолекулярных белков (вероятно, гамма-глобулинов), обуславливающих оставшиеся 8-19% бета-лактамазной активности крови.

Данные выводы, полученные на основании косвенных экспериментальных данных, хорошо согласуются с ранее полученными нами сведениями, согласно которым, в крови больных и здоровых лиц имеются поликлональные IgG (гамма-глобулины), обладающие относительно невысокой, но достоверной бета-лактамазной активностью [1, 2]. Более того, ранее сообщалось, что продукты распада гема могут вызывать гидролиз боковых цепей некоторых цефалоспоринов [6]. Тем не менее, выявленные закономерности требуют дальнейшего всестороннего экспериментального подтверждения.

Литература:

- 1 Жильцов И.В., Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Генералов И.И. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах Мед панорама, 2006; №5 (62): 46-48
2. Жильцов И.В., Генералов И.И., Семенов В.М. Выявление абзимов с пенициллиназной активностью в сыворотке крови больных шигеллезами. Иммунопатол., аллергол., инфектол.; 2004, №3: 90-93.
3. Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М. и др. Бета-лактамазная активность белков человеческой крови: новый взгляд на патогенез антибиотикоустойчивости. Иммунопатол., аллергол., инфектол.; 2008; №2: 77-83
4. Lowry O H., Rosbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Quantitation of Protein. J. Biol. Chem.; 1951, 193: 265.
- 5 Menashi A.C., Abraham J., Antone Menashi A M A colorimetric procedure for measuring b-lactamase activity. Analytical Biochemistry; 1988; 168: 252-258.
- 6 E. Walter Wright, A Judith Frogge Hydrolysis of 3-Acetoxymethyl Cephalosporins by Lysed Whole Blood Antimicrobial Agents And Chemotherapy; 1980; Vol. 17, № 1: 99-100